

NP-43

(AN)



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 198 26 758 C 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/64
C 12 P 19/34
// A61K 48/00

⑳ Aktenzeichen: 198 26 758.4-41
㉔ Anmeldetag: 15. 6. 98
④③ Offenlegungstag: -
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 21. 10. 99

DE 198 26 758 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

<p>⑦③ Patentinhaber: Soft Gene GmbH, 14195 Berlin, DE</p>	<p>⑦② Erfinder: Junghans, Claas, 10587 Berlin, DE; Schroff, Matthias, 12205 Berlin, DE</p> <p>⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften: WO 98 21 322 A1</p>
--	--

- ⑤④ **Darstellung von linearen kovalent geschlossenen DNA-Molekülen als Expressionskonstrukte**
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft eine Methode, mit der hantelför-
mige Expressionskonstrukte aus Plasmid-DNA hergestellt
werden können. Die entstehenden hantelförmigen Mole-
küle werden als Mischung mit Plasmidsequenzen herge-
stellt und durch anschließenden sequenzspezifischen
Verdau der unerwünschten Nebenprodukte durch Exonu-
kleasen gereinigt.

DE 198 26 758 C 1

Beschreibung

Gentherapie und genetische Vakzinierung sind moderne Methoden der Molekularen Medizin, deren Anwendung in der Therapie und Prävention von Erkrankungen erhebliche Konsequenzen für die medizinische Praxis haben wird. Beide Methoden beruhen grundsätzlich auf der Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen oder Gewebe des Patienten, sowie der anschließenden Verarbeitung der auf den eingebrachten Nukleinsäuren beinhalteten Information ("Expression"). Allerdings bedürfen auf Expressionssystemen beruhende medizinische Methoden vor ihrer breiten Anwendung noch der Lösung einiger grundsätzlicher Probleme.

Eines dieser Probleme ist der sichere, zell- oder gewebe-spezifische und effiziente Transfer der Nukleinsäuren ins Zielgewebe; ein anderes die möglichen Wirkungen von Sequenzen, die herstellungs- oder konstruktionsbedingt als Teil der verabreichten Expressionskonstrukte, aber nicht als Teil der intendierten zu exprimierenden Information, an den Wirkort gelangen. Mögliche Lösungen für diese Probleme wurden in unserer Anmeldung "Designprinzip für die Konstruktion von Expressionskonstrukten für die Gentherapie" (Anmeldung WO 98/21322) skizziert. Zentraler Aspekt der dort erörterten Erfindung ist ein hantelförmiges, linear doppelsträngiges DNA-Molekül als Expressionskonstrukt.

Es sind mehrere Methoden zur Darstellung solcher Konstrukte bekannt. Entweder geht man dabei von der Synthese des das Expressionskonstrukt bildenden Doppelstranges durch Amplifikation per Polymerase-Kettenreaktion aus, wobei die entstehenden doppelsträngigen, nicht kovalentgeschlossenen Moleküle dann durch anschließenden Verdau der Enden mit einer Einzelstrang-Überhänge bildenden Restriktionsendonuklease und anschließender Ligation von auf die entstandenen Überhänge passenden Haarnadel-Oligomeren zu hantelförmigen Konstrukten modifiziert werden. Dieses Vorgehen führt zu einem relativ einfach aufzureinigenden Rohprodukt aus hantelförmigen Expressionskonstrukten, dem gewünschten Produkt, sowie Verunreinigungen durch Oligomere aus eingesetztem Primer sowie anligierten Haarnadel-Oligomeren. Allerdings bringt die Synthese durch PCR neben dem ökonomisch ungünstigen Einsatz der thermostabilen DNA-Polymerasen deren relativ hohe Fehlerrate der Synthese mit sich, was zu für pharmazeutische Produkte intolerablen Unreinheiten im Produkt führen könnte.

Alternativ können die Konstrukte als Teil eines in Bakterien replizierbaren Konstruktes biotechnologisch hergestellt werden, anschließend durch Restriktionsverdau von den unerwünschten DNA-Fragmenten, die zur Vermehrung des Konstruktes in den Bakterien dienten, getrennt werden und nach Aufreinigung analog dem für PCR-Produkte skizzierten Vorgehen in hantelförmige Moleküle umgewandelt werden.

Das Aufreinigen der verschiedenen so aus dem Restriktionsverdau der Replikationskonstrukte hervorgehenden Fragmente kann technisch sehr schwierig sein, weil die Mindestgröße eines bakteriellen Resistenzgens in der gleichen Größenordnung wie die Größe der Expressionskonstrukte für die Gentherapie liegt. Die Basislinientrennung durch chromatographische Verfahren von Restriktionsfragmenten in der Größenordnung von einem bis drei Kilobasenpaaren DNA kann erhebliche technische Probleme aufwerfen. Eine Methode zur Darstellung der hantelförmigen Expressionskonstrukte, die diese Problematik vermeiden würde, wäre also von erheblichem praktischen Interesse.

Erfindungsgemäße technische Lösung:

Erfindungsgemäß wird das DNA-Molekül, welches den

Hauptteil des darzustellenden Expressionskonstruktes bildet, durch fermentative Vermehrung und anschließender Isolierung als Teil eines in Bakterien replizierbaren Plasmids synthetisiert. Besagtes DNA-Molekül wird dann aus dem Plasmid, in dem es in einfacher oder mehrfacher Kopie vorliegen kann, durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten, die an den entstehenden Schnittstellen kurze einzelsträngige Überhänge bilden. In einem anschließenden Schritt wird das Rohgemisch aus DNA-Molekülen, die den Hauptteil des darzustellenden Expressionskonstruktes bilden, und bakteriellen Restsequenzen wie Antibiotikaresistenzgenen, Replikationsursprüngen u.v.m., der Ligation mit kurzen, haarnadel-förmigen DNA-Oligomeren zugeführt. Besagte Oligomere tragen dabei einen einzelsträngigen Überhang, der auf den oder die einzelsträngigen Überhänge der Expressionskonstrukte passt und so zu einem linearen kovalent geschlossenen doppelsträngigen Expressionskonstrukt führt.

Kern der Erfindung ist nun, daß aus dem entstehenden Rohgemisch aus linearen kovalent geschlossenen doppelsträngigen Expressionskonstrukten sowie Restsequenzen, die durch die Behandlung mit Haarnadel-Oligomeren und Ligase ebenfalls zum größten Teil als linear kovalent geschlossene Moleküle vorliegen, letztere durch zwei enzymatische Schritte vollständig entfernt werden: zuerst werden die unerwünschten Moleküle durch Verdau mit einem Restriktionsenzym zerschnitten, dessen Erkennungssequenz nur auf den unerwünschten Fremdmolekülen liegt, so daß die als Produkt gewünschten Expressionskonstrukte kovalent geschlossen bleiben. In einem zweiten Schritt werden dann die geschnittenen Moleküle mit einer Exonuklease verdaut, so daß nur die gewünschten Moleküle im Reaktionsgemisch als Polymere verbleiben. Dies führt dazu, daß im Reaktionsgemisch nur eine Spezies langkettiger DNA-Moleküle vorliegt, wodurch diese der Aufreinigung durch bekannte Methoden der Ionenaustauschchromatographie zugänglich ist.

Ein weiterer, sekundärer Aspekt der hier vorgestellten Erfindung ist, daß die Menge der zur Ligation an die durch Restriktionsverdau entstandenen Fragmente erheblich vermindert werden kann, wenn man die Ligation in Anwesenheit von Restriktionsendonukleasen ablaufen läßt, die im Verlaufe der Ligation entstehenden unerwünschten Verbindungen aus Ligationspartnern in-situ wieder lösen. Es mußte bisher bei der Ligation in Abhängigkeit von der Länge der zu ligierenden Fragmente und deren Konzentration ein bis zu 200-facher Überschuß an Oligomeren in Bezug auf die Enden der zu ligierenden Restriktionsfragmente eingesetzt werden. Dies ist der Fall, weil die Restriktionsfragmente intra- und intermolekular mit anderen Restriktionsfragmenten reagieren können. Der genannte Überschuß an Haarnadel-Oligomeren verschiebt das Gleichgewicht von der intra- oder intermolekularen Reaktion eines polymeren Restriktionsfragmentes mit einem anderen ganz auf die Seite der Reaktion mit den Oligomeren, führt aber zu einem sehr hohen Anteil der Oligomere im Reaktionsgemisch. Neben den dadurch entstehenden Kosten ist daran nachteilig, daß diese Oligomere als teilweise einzelsträngige DNA-Moleküle enzymatische Reaktionen unspezifisch hemmen können.

Ligieren dabei zwei aus Verdau mit der gleichen Endonuklease entstandene polymeren Restriktionsfragmente miteinander, so rekonstituieren sie wieder die ursprüngliche Schnittstelle. Diese Reaktion läßt sich in-situ durch Verdau mit der betreffenden Endonuklease rückgängig machen.

Um dabei die Ligation von Oligomeren an die Restriktionsfragmente nicht ebenfalls wieder rückgängig zu machen, muß die direkt neben dem Überhang liegende Sequenz der Oligomere so gewählt werden, daß sie bei Ligation an die

Restriktionsfragmente die Schnittstelle nicht rekonstituiert. Vorteilhafterweise wird diese Sequenz vielmehr so gewählt, daß eine nicht palindromische Sequenz bei Ligation des Oligomers an den Überhang des Restriktionsfragmentes entsteht, die vor weiterem Verdau geschützt ist, und ebenfalls so, daß bei Reaktion des Oligomers mit einem weiteren Exemplar Oligomer passender Sequenz ein Dimer entsteht, daß eine palindromische Sequenz entsteht, die durch eine zweite, in der Reaktionslösung enthaltene Endonuklease wieder gespalten werden kann. Auf diese Weise können in einem Eintopfverfahren durch eine Ligase und zwei Endonukleasen relativ kleine Überschüsse Harnadel-Oligomere ausreichen, zu einem definierten Produkt aus linearen kovalent geschlossenen Monomeren des Expressionskonstruktes sowie der begleitenden, später abgetrennten Fremdsequenzen zu kommen.

Beispiel:

1 mg des Plasmids MTV2-EGFP (Sequenz siehe Anhang) wurde mit den Restriktionsendonuklease Eco RI vollständig verdaut. 1 mg des 5'-phosphorylierten Desoxyoligoribonukleotids mit der Sequenz AATTGGCCGGCCGTTTCGGCCGGCC (TIB Molbiol, Berlin) wurden mit 100 U T4 DNA-Ligase (MBI, Heidelberg) in 5 ml Reaktionspuffer bei 14°C über Nacht umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 60°C gestoppt.

Das entstandene Reaktionsgemisch wurde konzentriert und nach Umpuffern mit 100 U Restriktionsendonuklease Afl III sowie 100 U T7-DNA-Polymerase in Abwesenheit von Desoxynukleotiden 1 h verdaut. Das entstandene Produkt wurde per Anionen-Austausch-Chromatographie gereinigt und war nach Kontrolle durch Gelelektrophorese sowie PCR-Kontrolle frei von Resten des unerwünschten Fragmentes.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Darstellung eines linearen kovalent geschlossenen doppelsträngigen DNA-Moleküls, bestehend aus

- Vermehrung des das Molekül hauptsächlich bildenden DNA Doppelstranges als Teil eines bakteriell replizierbaren Konstrukts,
- Isolierung des bakteriell replizierbaren Konstrukts,
- Ausschneiden des das Molekül hauptsächlich bildenden DNA Doppelstranges mittels einer oder mehrerer DNA-Restriktionsendonukleasen, deren Erkennungssequenzen die Sequenz des das Molekül hauptsächlich bildenden DNA Doppelstranges an beiden Seiten unmittelbar einschließen, und deren Aktivität an der Schnittstelle kurze überstehende Enden aus einzelsträngiger DNA hinterlassen,
- Ligation der so entstandenen Restriktionsfragmente mit Haarnadel-förmigen selbstkomplementären Desoxyoligonukleotiden, die kurze, auf die besagte Restriktionsfragmentenden passende Einzelstrangüberhänge aufweisen, so daß bei der Ligrationsreaktion zwischen Desoxyoligomer und Restriktionsfragment an beiden Seiten ein kovalent geschlossener Einzelstrang entsteht,
- anschließend Verdau des entstandenen Reaktionsgemisches mittels einer Restriktionsendonuklease, die eine auf dem darzustellenden Molekül nicht vorhandene, auf dem Rest des bakteriell replizierbaren Konstrukts aber mindestens

einmal vorhandene Erkennungssequenz erkennt und schneidet,

- und anschließend oder gleichzeitigen Verdau der Reaktionsmischung mittels einer ausschließlich für freie 3'- oder 5'-DNA-Enden spezifischen Exonuklease.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei welchem das linear kovalent geschlossene DNA-Molekül ein Expressionskonstrukt, bestehend aus Promotorsequenz, kodierender Sequenz und Terminatorsequenz, ist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Haarnadel-förmigen selbstkomplementären Desoxyoligonukleotide eine solche Sequenz in ihrem Einzelstrangüberhang aufweisen, daß bei der Ligrationsreaktion zwischen Desoxyoligomer und polymeren Restriktionsfragment keine palindromische Sequenz entsteht, und wobei während der Ligrationsreaktion solche Restriktionsendonukleasen anwesend sind, daß durch intra- oder intermolekulare Ligrationsreaktionen der polymeren Restriktionsfragmente oder der Oligomere entstehende Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen diese in situ wieder geschnitten werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, bei dem das Verfahren durch festphasengebundene Enzyme durchgeführt wird.